

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

SEARCH INDEX DETAIL JAPANESE

1 / 1

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(41) Publication number : 05-000081
 (43) Date of publication of application : 08.01.1993

(51) Int.CI.

C12N 5/06
C12N 11/02(21) Application number : 03-175771
 (22) Date of filing : 21.06.1991(71) Applicant : KOKEN CO LTD
 (72) Inventor : KUROYANAGI TAKAMITSU
 NAKAGAWA RIKO
 MIYATA TERUO**(54) CARRIER FOR CELL CULTURE AND CULTURE****(57) Abstract:**

PURPOSE: To obtain the subject carrier for cell culture, suitable for long-term culture in a state where the carrier is allowed to stand in a column by specifying the diameter of an alginic acid salt bead to be coated with a collagen coating layer.

CONSTITUTION: Cells are made to adhere to the collagen coating layer on the surface of a bead 2 made of an alginic acid salt 1 and having 1-5mm diameter and filled in a column so as to be cultured in a culture medium. The bead is in a gel state containing a high-content water and the culture medium can freely flow through the inside of the bead as shown by the arrow mark. The average particle size of the bead is preferably about 3mm.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]	17.06.1998
[Date of sending the examiner's decision of rejection]	25.07.2000
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]	
[Date of final disposal for application]	
[Patent number]	
[Date of registration]	
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]	
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]	
[Date of extinction of right]	

Copyright (C); 1998,2000 Japanese Patent Office

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-81

(43)公開日 平成5年(1993)1月8日

(51)Int.Cl.
C 12 N 5/06
11/02

識別記号 庁内整理番号
2121-4B
7236-4B

F I
C 12 N 5/ 00

技術表示箇所
E

審査請求 未請求 請求項の数2(全4頁)

(21)出願番号 特願平3-175771

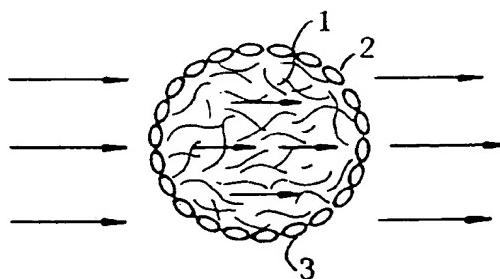
(22)出願日 平成3年(1991)6月21日

(71)出願人 591071104
株式会社高研
東京都新宿区下落合3丁目5-18
(72)発明者 黒柳 能光
神奈川県座間市小松原2-5137-1-701
(72)発明者 中川 理歌
神奈川県相模原市御園2-15-7-201
(72)発明者 宮田 輝夫
東京都新宿区下落合3-6-29-314
(74)代理人 弁理士 田中 宏 (外1名)

(54)【発明の名称】 細胞培養担体及び培養方法

(57)【要約】

【目的】カラム内に静置させて長期間培養するのに適した新規な細胞培養担体に関する。
【構成】粒状のアルギン酸塩よりなるビーズ表面にコラーゲンからなる被覆層を設けた細胞担体である。



〔特許請求の範囲〕

〔請求項1〕直徑1～5mmの粒状のアルギン酸塩よりなるビーズ表面にコラーゲンよりなる被覆層を設けたことを特徴とする細胞培養担体

〔請求項2〕直徑1～5mmの粒状のアルギン酸塩よりなるビーズ表面にコラーゲンよりなる被覆層を設けた細胞培養担体に細胞を付着、これをカラム中に充填し、該カラムに培地を供給して細胞を培養する方法

〔発明の詳細な説明〕

〔0001〕

〔産業上の利用分野〕本発明は、付着細胞を培養する際に使用される細胞培養担体に関し、特に長期間安定に細胞を保持できる培養系を確立できる培養担体に関する。

〔0002〕

〔従来の技術〕遺伝子工学の技術を駆使した生理活性物質の生産は、大腸菌や酵母などの微生物を利用して行なわれている。しかし、微生物を用いて生産したタンパク性の生理活性物質は、糖鎖の付加や部分的アミノ酸の除去などの動物細胞に特有な反応を受けておらず、その立体構造が目的とするものと僅かに異なり生理活性も低い場合がある。そのため、遺伝子操作をした動物細胞を大量に培養し、培養液中に產生された生理活性物質を取り出して精製する手法が採られている。

〔0003〕動物細胞は培養液中に浮遊して増殖する浮遊細胞と固い支持体に接着してはじめて増殖できる付着細胞とに大分できる。浮遊細胞は一般にタンク培養が行なわれるが、付着細胞の場合には細胞を何らかの支持担体に付着させ、細胞を付着させた支持担体を浮遊化培養する必要がある。この培養方法はマイクロキャリヤー法と称され、マイクロキャリヤー法における支持体（マイクロキャリア）としては架橋デキストラン、セルロース顆粒体などの天然物由來の素材を使用したビーズ或いは（メタ）アクリル酸エステルよりなる重合体粒子表面に正に荷電し得る化学的残基又は蛋白質を化学結合したマイクロキャリア（特開昭63-71173号公報参照）等がある。

〔0004〕しかして、天然物由來の素材からなるビーズは非常に高価であり、その点（メタ）アクリル酸エステル重合体を使用したマイクロキャリアは有利ではあるがキャリア内部から養分を供給できないという欠点があった。また、これらのビーズを使用したマイクロキャリヤー法にあってはビーズに付着した細胞は培地中で浮遊させて攪拌するためビーズに付着した細胞が機械的なダメージを受けるという問題がある。

〔0005〕

〔発明が解決しようとする課題〕本発明は、上記の問題点を解決すべく種々検討した結果、本発明を完成したもので、本発明の目的はカラム内に静置させて、長期間培養するのに適した新規な細胞培養担体を提供するにある。

〔0006〕

〔問題点を解決するための手段〕本願発明の要旨は直徑1～5mmの粒状のアルギン酸塩よりなるビーズ表面にコラーゲンよりなる被覆層を設けたことを特徴とする細胞培養担体であり、該細胞培養担体に細胞を付着、これをカラム中に充填し、該カラムに培地を供給して細胞を培養する方法である。

〔0007〕すなわち、本発明においては、細胞培養担体を構成する母体としてアルギン酸塩を使用するものであり、該塩を使用することによって高含水性のビーズを作製することができ、担体内部からも養分の供給が可能となり、また、このビーズは、従来のものに比して、その大きさが大きく、この担体に細胞を付着後これをカラム内に充填した状態でも定期的に培地を交換することによって細胞を長期間安定に生存させることができた。

〔0008〕更に本発明を詳細に述べる。本発明におけるアルギン酸塩は高含水性ゲルであり、その塩としてはカルシウム塩、ストロンチウム塩等のアルカリ土類金属塩である。そして、このアルギン酸塩の実質重量は全体の約1%程度であって、残余の約99%は培地が含有された状態である。このビーズの平均粒径は含水状態で1～5mm範囲であり、特に好ましい平均粒径は約3mmである。

〔0009〕コラーゲンは動物の結合組織を構成しているタンパク質であり不溶性であるが、特に本発明で使用するのに好ましいコラーゲンとしては、その分子末端に存在し抗原性を発揮するテロペプチドをペプシンで処理して得られるアテロコラーゲンである。また、本願発明においては可溶化コラーゲンより誘導されるもの、例えばサクシニル化コラーゲン、メチル化コラーゲン等も使用できる。

〔0010〕本発明にかかる細胞培養担体の製造方法の一例について示す。アルギン酸金属塩よりなるビーズの製造法としては、水溶性アルギン酸金属塩を注射針などを用いて粒子状にして塩化カルシウム等の水溶液中に滴下する。この場合水溶性アルギン酸金属塩水溶液の濃度としては1～2%、好ましくは1%程度であって濃度が高い場合は粘度が高く注射針から細かな粒子状として滴下することが困難であり、また濃度が低い場合には十分な強度を保持できるビーズが得られない。また、このビーズ表面にコラーゲン被膜層を設ける方法は、特に限定されるものではないが、アルギン酸塩よりなるビーズが高含水状態にあるため被膜層は設けにくい。しかし、例えばエポキシ化合物を用いて分子間結合させることによって容易に被膜層を形成することができる。得られた細胞培養担体は約70%エタノール中で保存するか、或いは、Hank's液に浸漬した状態でガンマ線を照射して滅菌して保存する。

〔0011〕次にこの細胞培養担体を用いた培養方法に

3

について説明する。本発明にかかる細胞培養担体は、培地中に浮遊させて培養するマイクロキャリヤー法におけるビーズとして使用することも出来るが、特にカラム内に静置させて培養することができる。即ち、約70%エタノール中で保存してあるビーズを使用前にHank's液で充分リーンスするか、或いは、Hank's液に浸漬した状態でガンマ線を照射して滅菌を行ったのち、培地に置換し、ビーズ表面に細胞を付着させた後、カラムに充填する。カラム内には培地を流すと、培地はビーズ内をも流動することができる。その結果、ビーズ表面に接着した細胞はビーズ内部からも培地中の養分が供給され長期間安定に生存できる。この培養法はマイクロキャリヤー法のような培地中で攪拌することがないので、細胞がダメージを受けることが少ない。

【0012】図面について説明する。図1は、本発明の細胞培養担体（ビーズ）の説明図であり、図2は、これをカラムに充填した培養方法の説明図である。図1において、アルギン酸塩1よりなるビーズ2の表面のコラーゲン被覆層に細胞3が付着している。ビーズ2は、高含水ゲルの状態であって、培地はビーズ内を自由に流動することができる。図面の矢印はその状態を示す。図2において、細胞3を付着したビーズ2をカラム4の中に充填し、培地を一方の口5より注入し、他方の口6より注出する。注出口6には弁7を設けてカラム中を流れる培地の量をコントロールすることができる。

【0013】

【実施例】次に実施例をもって本発明を説明する。

実施例1

ビーズの製造法

1%アルギン酸ナトリウム水溶液を注射器を使用して、0.5%の塩化カルシウム水に攪拌しながら注射器を使用して滴下して粒径3mm程度のアルギン酸カルシウムよりなるビーズを作製した。過剰なカルシウムを除去するためイオン交換水で充分に洗滌した後、ビーズ表面の水を除去後、pH4に調整した1%アテロコラーゲン水溶液に浸漬し、適量のアテロコラーゲン水溶液がビーズ表面に付着した状態で離型紙にのせ、室温で3時間放置して表面を乾燥させた後、メタノール中にビーズを移して攪拌した。

【0014】得られたビーズをpH10に調整した1%の水溶性エポキシ化合物（EX313）に一昼夜浸漬して架橋を導入した。ビーズ表面のアテロコラーゲンよりなる被覆層を均一にするために上述の操作を繰返して行い被覆層を設けた。次いでこのビーズをイオン交換水で充分洗浄した後、70%エタノール中で保存した。得られたビーズの平均粒径は3.01mmであった。統いてこのビーズを用いて細胞培養試験を行った。

【0015】細胞培養試験

70%エタノール中で保存してある上記のビーズをオ-

4

トクレープで滅菌した蒸留水で充分洗滌した後、Hank's液で置換し、更にD MEM液に一昼夜浸漬した。培地（D MEM+10%FBS）で置換したビーズ20ml相当を50mlのプラスチック遠心管に移し細胞懸濁液を添加し、更に培地を添加して45mlに調整した後、遠心管を室温で3時間ゆっくりと回転させ、浮遊している細胞をビーズに接着させた。そして、その後37°C、5%CO₂のインキュベータ内で培養した。

【0016】使用した細胞はラット由来の線維芽細胞（3T3細胞）で、播種した細胞数は遠心管1本当たり5×10³cellsとした。細胞播種後2日、1週間、2週間及び3週目にトリプシン処理によりビーズより細胞を回収、血球計算盤を用いて細胞数を測定した。その結果を図3に示す。回収された細胞は培養シャーレ上で正常な増殖挙動を示した。

【0017】実施例2

実施例1に記載されている70%エタノール中で保存してあるビーズを実施例1の場合と同様の方法で細胞培養試験を行った。使用した細胞はヒト線維芽細胞で、播種した細胞数は各カラム当り5×10³cellsとした。細胞播種後、2日、1週間、2週間及び3週目にトリプシン処理によりビーズより細胞を回収し血球計算盤を用いて細胞数を測定した。その結果を図4に示す。回収された細胞は培養シャーレ上で正常な増殖挙動を示した。

【0018】

【発明の効果】以上述べたように、本発明はアルギン酸塩よりなるビーズ表面にコラーゲンよりなる被覆層を設けた新規な細胞培養担体であって、この担体に付着した細胞は担体内部からも養分の供給が可能であり、したがってビーズに付着した細胞の培養に当ってはマイクロキャリヤー法だけではなく、カラム内に充填した状態で定期的に培地を交換するだけで長期間安定に細胞を保持することができる等の効果を奏する。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明にかかる細胞培養担体の説明図

【図2】本発明にかかる細胞培養担体を用いてカラム培養の説明図

【図3】実施例1における培養時間と細胞数の関係図

【図4】実施例2における培養時間と細胞数の関係図

【符号の説明】

1 アルギン酸塩

2 ビーズ

3 ビーズ表面に付着した細胞

4 カラム

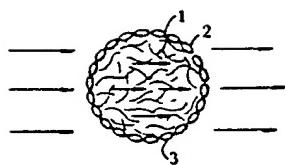
5 注入口

6 注出口

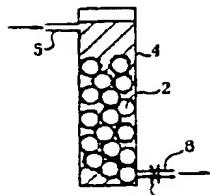
7 弁

(4)

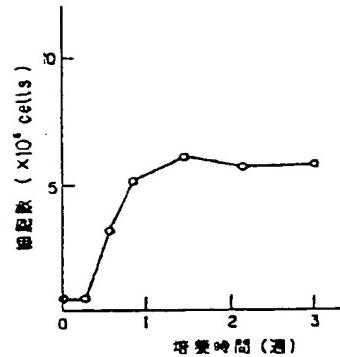
〔図1〕



〔図2〕



〔図3〕



〔図4〕

